



Άσκηση 3^η

Φασματοφωτομετρία





ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλασσικές (σχετίζονται με τη μάζα)

- ✓ Σταθμικές (ζυγός ακριβείας)
- ✓ Ογκομετρικές (βαθμ/να γυάλινα σκεύη)

2. Ενόργανες (σχετίζονται με την ενέργεια)

- ✓ Οπτικές (αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και δείγματος- απορρόφηση, εκπομπή, σκέδαση)
- ✓ Ηλεκτροχημικές (τελικό σημείο στις ογκομετρήσεις με ηλεκτρικές μετρήσεις)
- ✓ Ειδικές (χρωματογραφικές, ανοσοχημικές κ.λ.π.)

ΟΠΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

A. Φασματοσκοπικές Τεχνικές. Βασίζονται:

- i. στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να εκπέμπουν ή να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων
- ii. στη μέτρηση φασμάτων (μήκος κύματος, ισχύς-ένταση της ακτινοβολίας)

B. Μη Φασματοσκοπικές Τεχνικές. Βασίζονται:

στην αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης, η οποία συνεπάγεται αλλαγή στη διεύθυνση ή τις φυσικές ιδιότητες της ακτινοβολίας

- Δε χρησιμοποιούνται φάσματα

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1. Υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible – UV-Vis)

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εξωτερικών στοιβάδων

2. Υπερύθρου (Infra Red – IR)

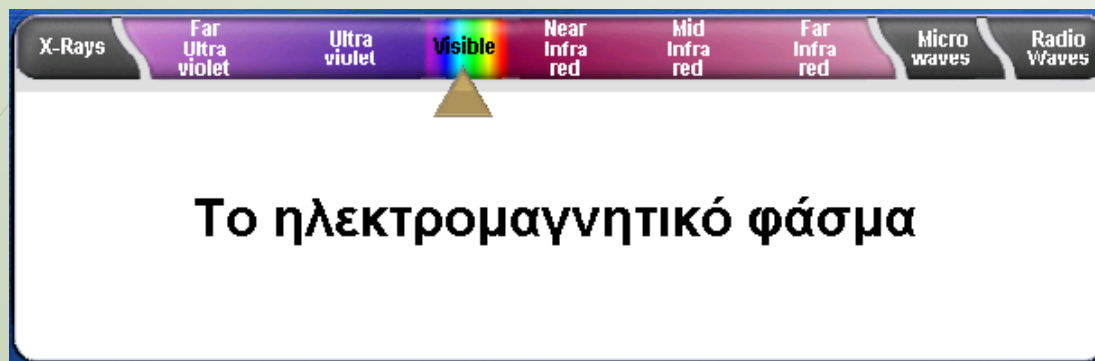
Η απορρόφηση υπερύθρου ακτινοβολίας προκαλεί διεγέρσεις δονήσεως, παραμορφώσεως και περιστροφής των δεσμών των μορίων

3. Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

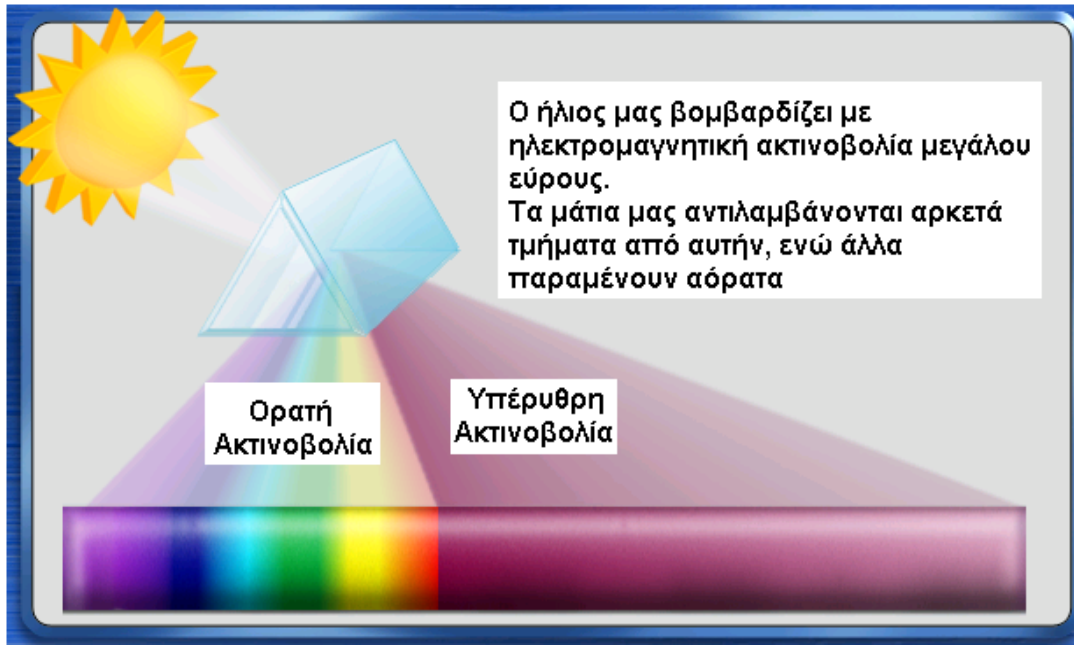
Μεταβολές στην ενέργεια των πυρήνων

4. Raman κ.α.

Σκεδαζόμενη ακτινοβολία



Τμήμα Ακτινοβολίας	Μήκος Κύματος
Ακτίνες Χ	0,3-100 Å
Υπεριώδες	200-400 nm
Ορατό	400-800 nm
Εγγύς Υπέρυθρο	0,8-2,5 μm (10000-4000 cm ⁻¹)
Υπέρυθρο	2,5-15 μm (4000-400 cm ⁻¹)
Άπω Υπέρυθρο	15-200 μm (400-10 cm ⁻¹)
Μικροκύματα	0,2-7,0 mm
Ραδιοσυχνότητες	100-10000 m

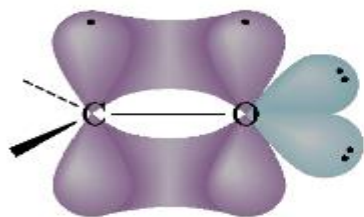
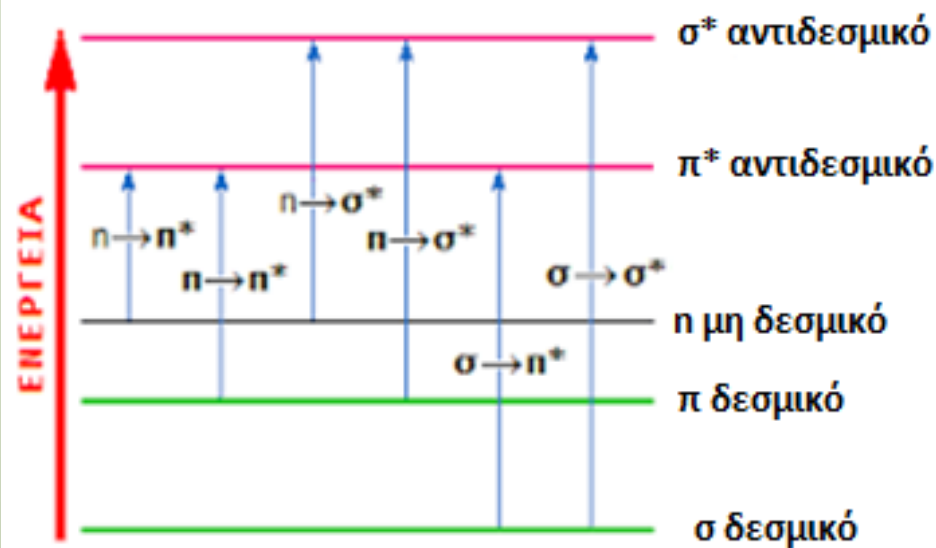


Φασματοσκοπία Υπεριώδους Ορατού (Ultra Violet – Visible, UV-Vis, ακτινοβολία 200 – 800 nm)

➤ Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλείται χρωμοφόρο, αυτό μπορεί να είναι μία χαρακτηριστική ομάδα, ένας απομονωμένος πολλαπλός δεσμός ή ένα σύστημα πολλαπλών δεσμών.

➤ Χρωμοφόρες ομάδες π.χ. $C=O$, $C=C$, $C=N$, $N=O$, $N=N$ κ.ά.

➤ Αυξόχρωμες ομάδες: είναι κορεσμένες ομάδες με ελεύθερα ζεύγη ηλεκτρονίων ($-OH$, $-OR$, $-NH_2$, αλογόνα)

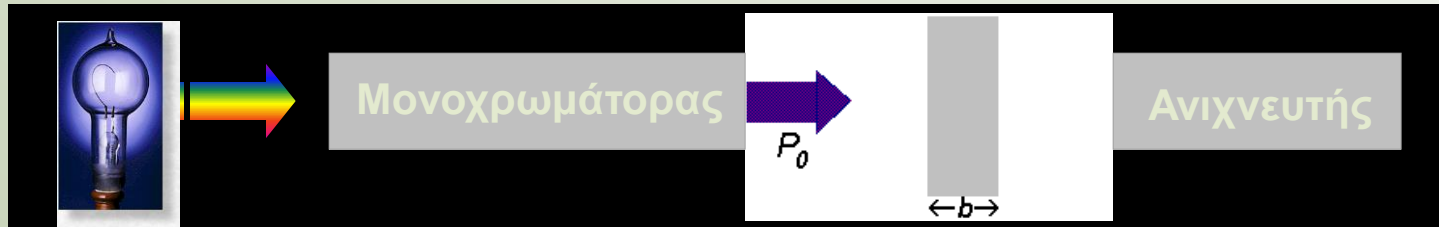


Καρβονυλική ομάδα



Αλκένιο

Νόμος των Beer-Lambert



$$A = \log(P_0 / P) = -\log T = \epsilon b c_{mol/L} = \alpha b c_{g/L}$$

A = Απορρόφηση (Absorbance). Καθαρός αριθμός.

P_0 = Ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

P = Ισχύς της εξερχόμενης από το διάλυμα ακτινοβολίας.

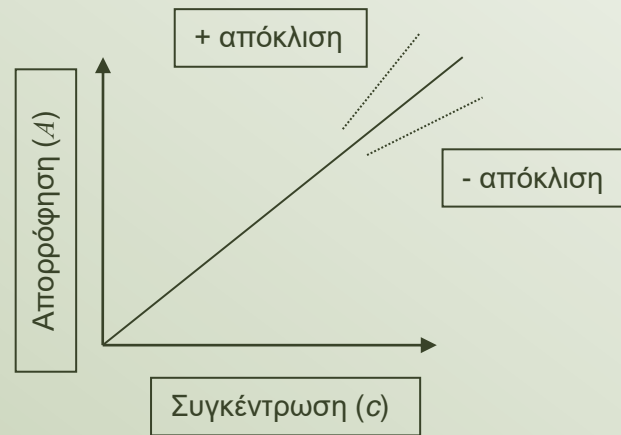
T = Διαπερατότητα (Transmittance) = P/P_0 που εκφράζεται συνήθως επί τοις % T .

c = η συγκέντρωση του διαλύματος σε mol/L ή g/L.

b = το μήκος της διαδρομής που διάνυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα σε cm.

ϵ = σταθερά αναλογίας που ονομάζεται μοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity) όταν η c εκφράζεται σε mol/L.

α = σταθερά αναλογίας που ονομάζεται απορροφητικότητα (absorptivity) όταν η c εκφράζεται σε g/L.

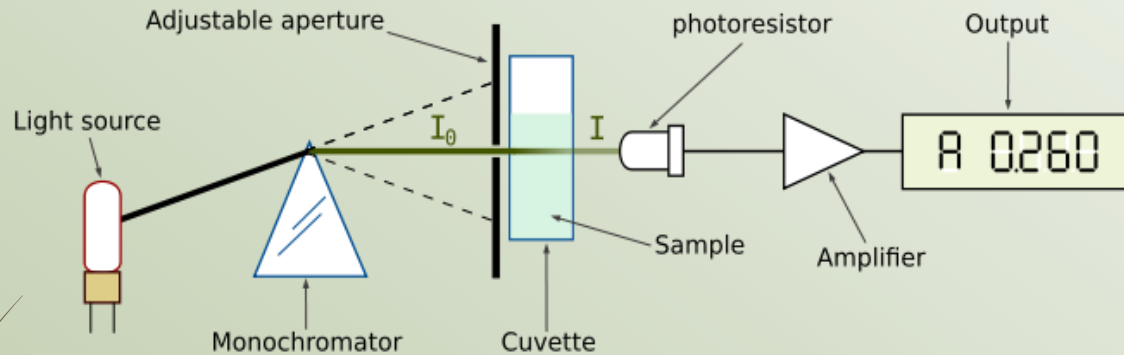


Ο νόμος του Beer ισχύει με τις εξής προϋποθέσεις :

- τα διαλύματα δεν είναι πυκνά (απορρόφηση από 0,1 έως 1)
- ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ διαλυμένης ουσίας και ακτινοβολίας είναι η απορρόφηση.
- η ακτινοβολία που πέφτει στο δείγμα είναι μονοχρωματική
- το δείγμα βρίσκεται σε κυψελίδα με ομοιόμορφη διατομή
- τα σωματίδια που απορροφούν δρουν ξεχωριστά το ένα από το άλλο και άσχετα προς τον αριθμό και το είδος τους. $A_{ολ} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$

Οργανολογία

Τα φασματοφωτόμετρα περιέχουν τις εξής βασικές δομικές μονάδες :



1. Πηγή Ακτινοβολίας σταθερής ισχύος,
2. Επιλογέας μήκους κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας
3. Κυψελίδα για την τοποθέτηση δείγματος
4. Ανιχνευτή ακτινοβολίας, που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό
5. Σύστημα μέτρησης, που αποτελείται από ενισχυτή σήματος και όργανο ανάγνωσης.

Οργανολογία



Φωτόμετρο

Κάθε όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Χρησιμοποιεί φίλτρο για την απομόνωση στενής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Φασματοφωτόμετρο

Πολυπλοκότερο και πιο ευέλικτο όργανο που χρησιμοποιείται για την καταγραφή ενός φάσματος απορρόφησης.

Χρησιμοποιεί μονοχρωμάτορα για να γίνεται η απομόνωση της μονοχρωματικής δέσμης.



Φάσμα απορρόφησης: Η απεικόνιση της απορρόφησης, της διαπερατότητας ή της έντασης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος.



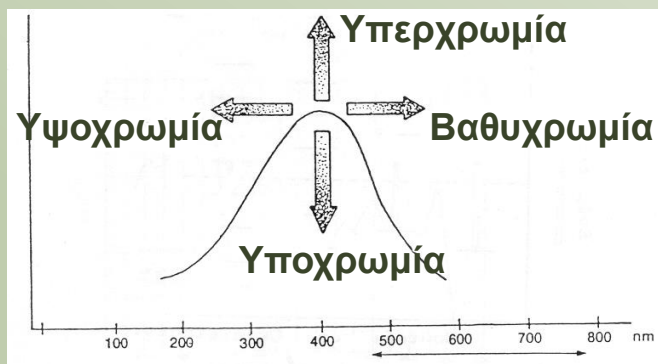
Φασματοσκοπία Υπεριώδους Ορατού (Ultra Violet – Visible, UV-Vis, ακτινοβολία 200 – 800 nm)

➤ **Βαθυχρωμία:** Η μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Προκαλείται από την ύπαρξη χρωμοφόρων ομάδων. Η παρουσία αυξόχρωμης ομάδας εντείνει, σε κάποιο βαθμό, τη βαθυχρωμία.

➤ **Υποχρωμία:** Η απομάκρυνση χρωμοφόρου ή αυξόχρωμης, σε μικρότερο βαθμό, ομάδας μετατοπίζει την απορρόφηση σε μικρότερα μήκη κύματος .

➤ **Υπερχρωμία:** Αύξηση της μοριακής απορροφητικότητας και επομένως αύξηση της απορρόφησης. Παρατηρείται με την εισαγωγή στο μόριο αυξόχρωμης ομάδας.

➤ **Υποχρωμία:** Μείωση της μοριακής απορροφητικότητας και επομένως μείωση της απορρόφησης. Παρατηρείται με την απομάκρυνση από το μόριο αυξόχρωμης ομάδας.

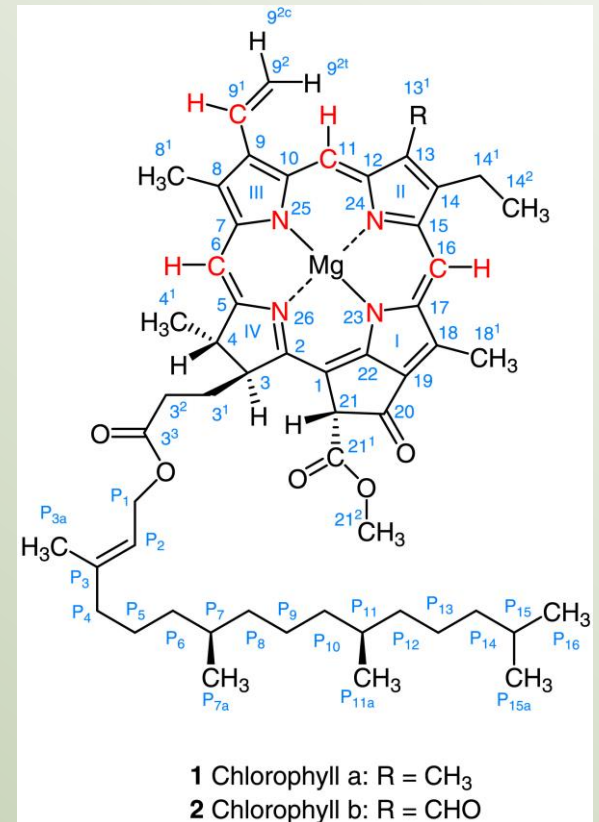




Εφαρμογές

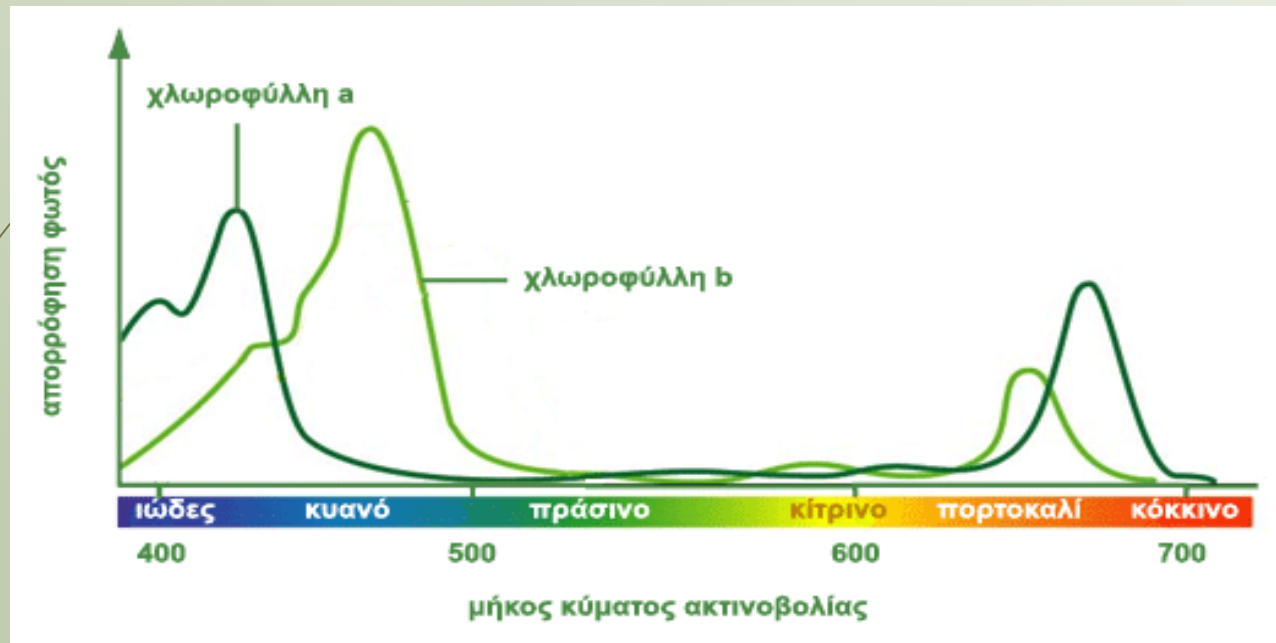
1. Προσδιορισμό της δομής μίας ένωσης
2. Ποιοτικό προσδιορισμό μίας ουσίας
3. Ποσοτική ανάλυση μίας ουσίας ή μίγματος ουσιών κ.ά.

A. Ποιοτικός προσδιορισμός α- και β- χλωροφύλλης με φωτομετρική μέθοδο σε δείγμα ζωοτροφών.



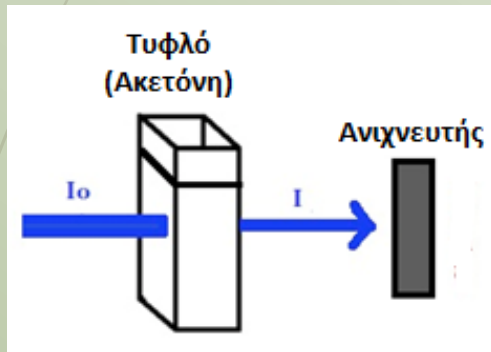
1. Επιλέξτε μήκος κύματος στο φωτόμετρο, $\lambda_{1\max} = 430 \text{ nm}$
(χλωροφύλλη A).

Το επιλεγμένα μήκη κύματος αντιστοιχούν στα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης των δύο χλωροφυλλών



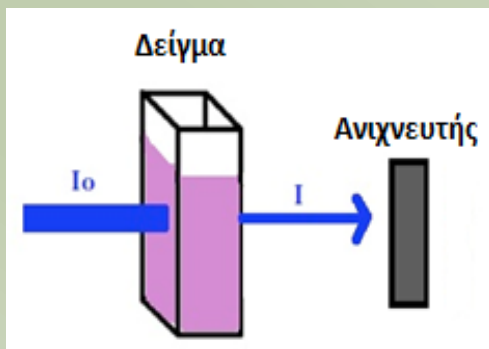
2. Τοποθετήστε το τυφλό δείγμα στην κυψελίδα (ακετόνη).

- ✓ Η κυψελίδα που περιέχει το λευκό διάλυμα ονομάζεται και κυψελίδα αναφοράς.
- ✓ Είναι κατασκευασμένη από χαλαζία, ή γυαλί ανάλογα με την περιοχή μέτρησης.



3. Μηδενίστε το φωτόμετρο (Θέτετε την τιμή της Απορρόφησης (A) στο 0).

- Με τον μηδενισμό αφαιρούνται οι απορροφήσεις τόσο της κυψελίδας όσο και του τυφλού δείγματος.



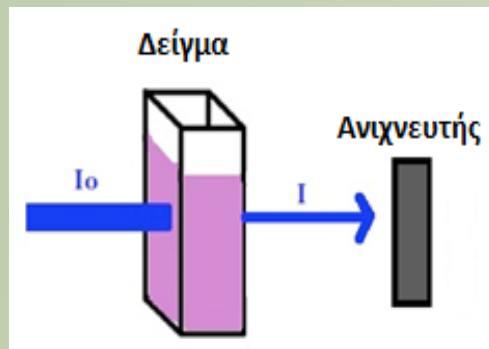
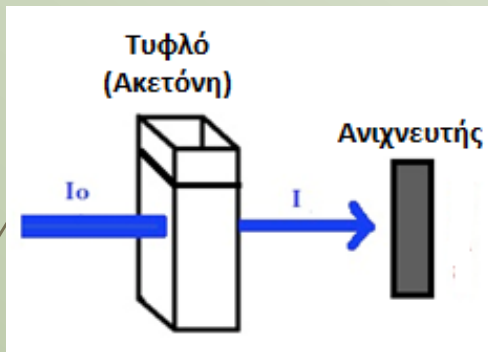
4. Φωτομετρήστε (μετρήστε A) το διήθημα στα

$$\lambda_{1\max} = 430 \text{ nm.}$$

5. Επιλέξτε μήκος κύματος στο φωτόμετρο,
 $\lambda_{2\max} = 455 \text{ nm}$ (χλωροφύλλη β).

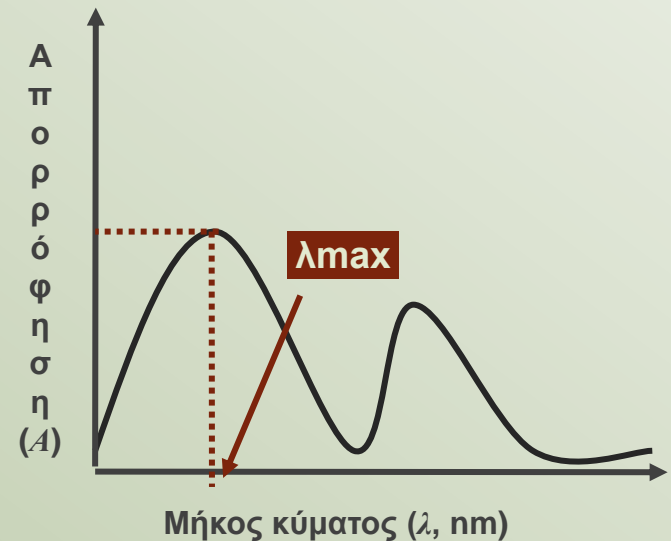
6. Μηδενίστε το φωτόμετρο με το τυφλό
δείγμα.

7. Φωτομετρήστε (μετρήστε A) το διήθημα στα
 $\lambda_{2\max} = 455 \text{ nm}$.

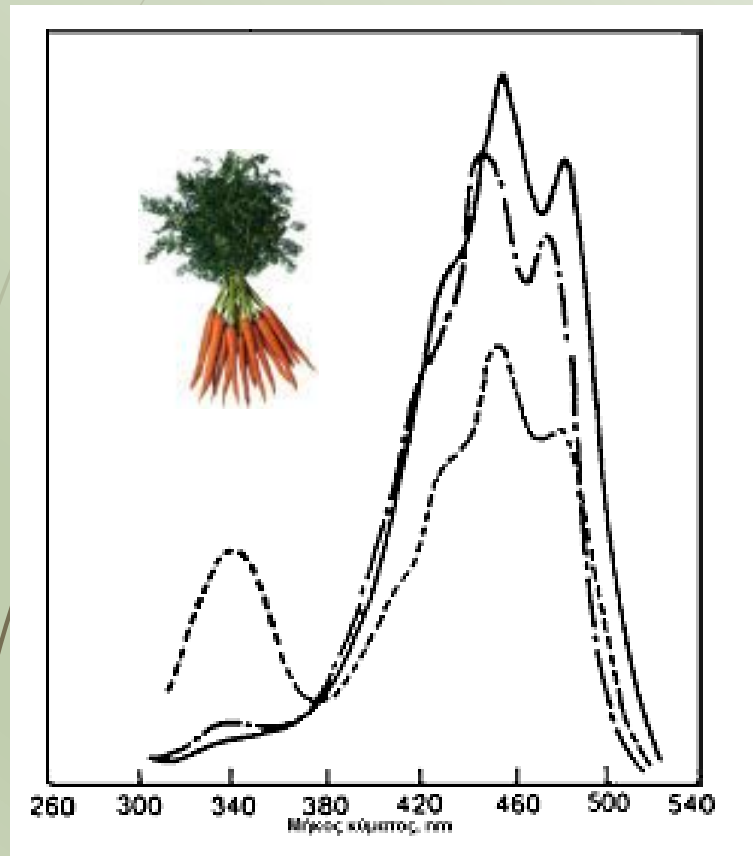


Β. Ποσοτική Ανάλυση Δείγματος

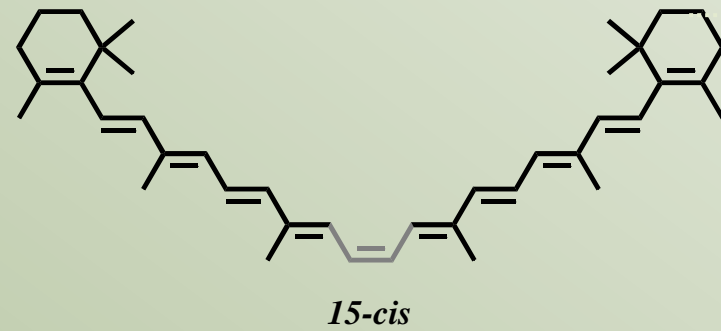
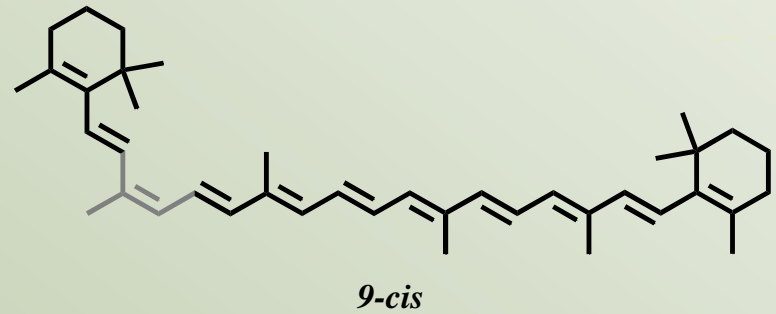
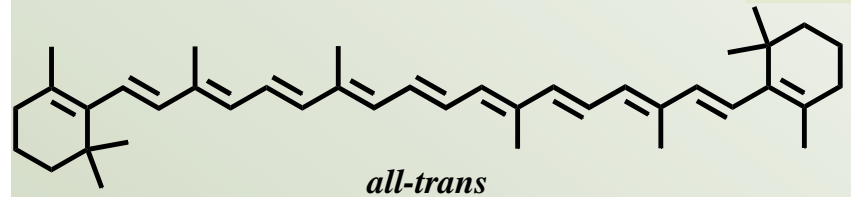
1. Καταγράφεται το φάσμα απορρόφησης του δείγματος
2. Επιλέγεται το κατάλληλο μήκος κύματος (λ_{max}), δηλαδή αυτό στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση για το δεδομένο δείγμα.



Φάσματα UV-Vis των ισομερών του
β-καροτενίου *all-trans*, *15-cis* και *9-cis*



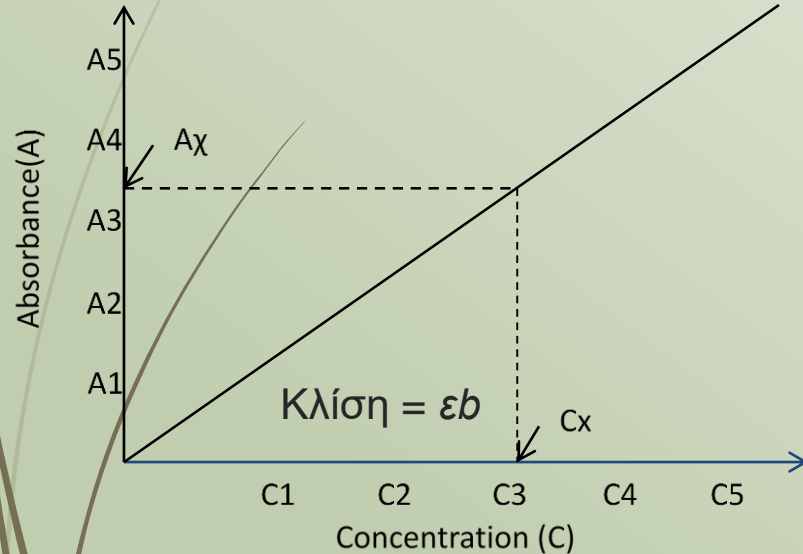
β-καροτένια



Ποσοτική Ανάλυση Δείγματος

3. Κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης ή καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη).

Καμπύλη αναφοράς - πρότυπη καμπύλη



Απεικονίζει το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα μιας ουσίας (A) σε μήκος κύματος λ_{max} , σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας (C).

Η συνάρτηση $A=f(C)$ χρησιμεύει στο να διαπιστώσουμε αν η ένωση που εξετάζουμε ακολουθεί τον νόμο Lambert-Beer και για να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της ουσίας σ' ένα διάλυμα της άγνωστης συγκέντρωσης



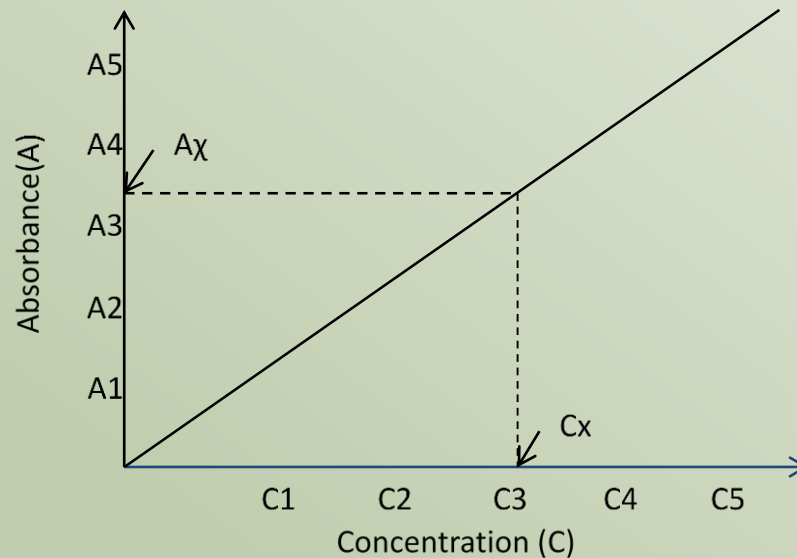
Ο νόμος του Beer ισχύει με τις εξής προϋποθέσεις :

- τα διαλύματα δεν είναι πυκνά (απορρόφηση από 0,1 έως 1)
- ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ διαλυμένης ουσίας και ακτινοβολίας είναι η απορρόφηση.
- η ακτινοβολία που πέφτει στο δείγμα είναι μονοχρωματική
- το δείγμα βρίσκεται σε κυψελίδα με ομοιόμορφη διατομή
- τα σωματίδια που απορροφούν δρουν ξεχωριστά το ένα από το άλλο και άσχετα προς τον αριθμό και το είδος τους. $A_{ολ} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$

Καμπύλη αναφοράς - πρότυπη καμπύλη

Απεικονίζει το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα μιας ουσίας (A) σε μήκος κύματος λ_{max} , σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας (C).

Η συνάρτηση $A=f(C)$ χρησιμεύει στο να διαπιστώσουμε αν η ένωση που εξετάζουμε ακολουθεί τον νόμο Lambert-Beer και για να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της ουσίας σ' ένα διάλυμα της άγνωστης συγκέντρωσης



Ποσοτικός Προσδιορισμός δείγματος β καροτενίου

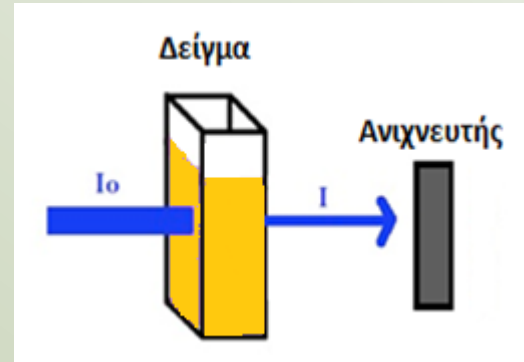
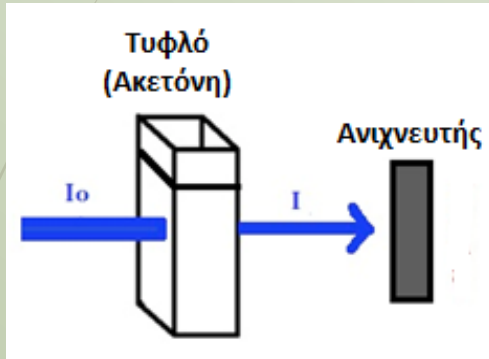
1. Ανάψτε το φασματοφωτόμετρο. Αφήστε να ζεσταθεί για 15 λεπτά.
2. Προετοιμάστε τα πρότυπα διαλύματα β-καροτενίου σε ακετόνη τελικού όγκου 5 mL από διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 40 mg/mL.

Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων β-καροτενίου σε ακετόνη πρέπει να είναι: 2 μg/mL, 4 μg/mL, 6 μg/mL και 8 μg/mL . – Εφαρμόστε τον νόμο της Αραίωσης



Ποσοτικός Προσδιορισμός δείγματος β καροτενίου

- Ξεπλύνετε τις κυψελίδες με ακετόνη καλά.
- Τοποθετήστε αρχικά σε μία κυψελίδα μόνο ακετόνη (τυφλό) και μηδενίστε το όργανο.



- Τοποθετήστε τα διαλύματα που παρασκευάσατε στις κυψελίδες.
- Βεβαιωθείτε ότι η διαφανής πλευρά της κυψελίδας είναι καθαρή. Καθαρίστε τη κυψελίδα με χαρτί. Προσοχή μην χαράξετε την κυψελίδα κατά τον καθαρισμό της.
- Μετρήστε τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων και καταγράψετε.
- Σε κενή κυψελίδα μεταφέρετε το προς προσδιορισμό διάλυμα και φωτομετρήστε.
- Καταγράψτε τις μετρήσεις

Καμπύλη αναφοράς - πρότυπη καμπύλη

X: 0, C1, C2... Cn

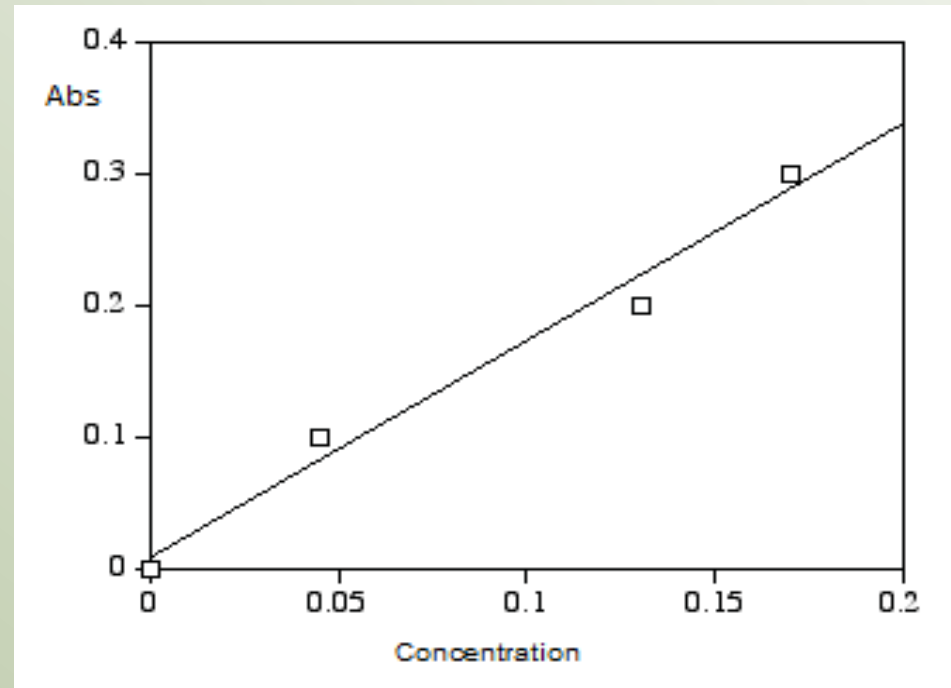
Y: 0, A1, A2...An

$$Y = \alpha(\text{κλίση})x + \beta(\text{τομή})$$

$$Y = f(X)$$

Με χρήση:

- ελαχίστων τετραγώνων
- προγράμματος EXCEL



Υπολογίστε τη συγκέντρωση του άγνωστου διαλύματος και ε

- 
- <https://www.youtube.com/watch?v=TU9lu8Ey63U>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=8efZRBCFpRg>